

nach BERGMAYER (4) zeigt eine Fehlerbreite von $\pm 2\%$. Die Ergebnisse resultieren aus einer Ablesung während der Katalasereaktion. Ablesungsfehler lassen sich korrigieren, wenn man mehrere Messungen in einem kurzen Reaktionsabschnitt vornimmt und zu einem Durch-

schnittswert zusammenfaßt (10). — Die Vorteile der hier beschriebenen Methode zur Katalaseaktivitätsbestimmung für klinische Zwecke bestehen im Vergleich zu älteren Methoden in ihrer schnelleren Durchführung und größeren Genauigkeit.

Literatur

1. HELLER, H., Röntgen-Laborat.praxis, Stuttgart 10, 183 (1957).
- 2. LÜCK, H., Biochem. Z. 328, 411 (1957). — 3. SCHÜTZ, E., Über die Katalaseaktivität des Säuglingsblutes und ihre Bestimmung mittels Polarographie, Med. Diss., Würzburg (1954).
- 4. BERGMAYER, H. U., Biochem. Z. 327, 255 (1955).
- 5. HERBERT, D., Methods in Enzymology Vol. II, 764, 780 (1955).
- 6. SENTER, G., Z. physik. Chem. 44, 257, (1903).
- 7. v. EULER, H. und K. JOSEPHSON, Liebigs Ann. Chem. 452, 158 (1927); 455, 1 (1927).
- 8. ZEILE, K., Katalase, S. 2615 aus Bamann, E. und K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung III, Georg Thieme, Leipzig (1941).
- 9. v. EULER, H. und K. ZEILE, Die Katalasen, aus v. Euler, H., Chemie der Enzyme II, 3. Bergmann, München S. 663 (1934).
- 10. HEIDER, H., Die Blutkatalaseaktivität im Kindesalter und ihre Beeinflussung durch bestimmte Erkrankungen und Vitamin K-Präparate, Med. Diss., Berlin (1962).
- 11. HOFFMANN-OSTENHOF, O., Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 6, 154 (1950).
- 12. SEIDE, G., Biochem. Z. 308, 175 (1941).
- 13. BISCHOFF, H., Arch. Kinderhk., Stuttgart 82, 189 (1927).
- 14. BEERS, R. F. und J. W. SIZER, J. biol. Chemistry 195, 133 (1952).
- 15. KUROKAWA, H., Tohoku J. Exper. Med. 14, 520, 539 (1929/30).
- 16. v. THIEMEN, G. J., Dtsch. Arch. klin. Med. 131, 113 (1920).
- 17. JONES, P. E. H. und R. A. McCANCE, Biochem. J. 45, 464 (1949).
- 18. MORGULIS, S. und M. BEBER, J. biol. Chemistry 72, 91 (1926).
- 19. THEORELL, H., Experientia, Basel 4, 100 (1948).

Priv.-Doz. Dr. med. Egon Werner
Kinderklinik der Freien Universität Berlin
(Kaiserin Auguste Victoria Haus)
1 Berlin 19, Heubnerweg 6

Isolierung und Feststellung der chemischen Zusammensetzung eines Perchlorsäure-löslichen Glykoproteids aus dem Urin von Plasmocytom-Kranken*)

Von

H. WEICKER, K. HUHNSTOCK und D. GRÄSSLIN

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Heidelberg (Direktor: Professor Dr. H. Plügge)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor S. J. THANNHAUSER, zum Gedächtnis

(Der Schriftleitung zugegangen am 6. März 1963)

Aus dem Gesamturoprotein-Komplex von Plasmocytom-Patienten wurde durch Hydrolyse und nachfolgende Lipid-Extraktion der gefriertrocknen Substanz ein Glykopeptid isoliert, das ein Molekulargewicht von 19 900 besitzt. In Ultrazentrifuge und Elektrophorese ist es homogen. Es ist in Wasser hitzestabil, in 0,6 m Perchlorsäure gut löslich, in 10 proz. Trichloressigsäure hingegen unlöslich. Es enthält 16 verschiedene Aminosäuren und ist methioninfrei. Der Gesamtkohlenhydratgehalt beträgt 38,1%. Die Kohlenhydrate haben folgende molare Verteilung: Ga:Ma:Glu:Fu:Rh:GIA:GaA:NS = 10:5:5:4:2:8:2:5. Es unterscheidet sich physiko-chemisch von anderen Perchlorsäure-löslichen Proteiden des Serums und Urins. Es dürfte für die Uroproteine des Plasmocytoms charakteristisch sein, da es im Harn von Normalpersonen und bei Proteinurien anderer Genese nicht isoliert werden konnte.

A glycopeptide, molecular weight 19.900, was isolated from the total uroprotein complex of plasmacytoma patients by lipid extraction of the freeze-dried product after hydrolysis. It is homogeneous in the ultracentrifuge and in electrophoresis. It is thermostable in water, very soluble in 0.6 M perchloric acid and insoluble in 10% TCA. It contains 16 different amino acids and no methionine. The total carbohydrate is 38.1% and of the following molar composition: Ga:Ma:Glu:Fu:Rh:GIA:GaA:NA = 10:5:5:4:2:8:2:5. Physicochemically, it is different from other perchloric acid-soluble proteins of serum and urine. It could not be found in normal urine or that from other types of proteinuria; it may thus be a characteristic uroprotein of plasmacytoma.

*) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Bei Plasmocytomen und Makroglobulinämie Waldenström konnten die Gesamt-Uroproteine durch Hydrolyse mit Wasser bei 65° und 70° und anschließender Lipidextraktion in mehrere Uroprotein-Fractionen aufgetrennt werden, die sich in ihrem Molekulargewicht, Polypeptid- und Kohlenhydratgehalt, in ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und ihrem immunoelektrophoretischen Verhalten unterscheiden (1, 2, 3, 4). Aus dem Proteid nach Lipidextraktion konnte ein relativ niedermolekulares Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 19 900¹⁾ isoliert werden. Es erwies sich in Elektrophorese und Ultrazentrifuge als einheitliche Substanz. Nach seiner Aminosäure- und Kohlenhydratzusammensetzung und seinen physiko-chemischen Eigenschaften unterscheidet es sich von anderen Glykoproteiden und Mucoiden des Serums und des Urins. Es ist zu erwarten, daß dieses kohlenhydratreiche, niedermolekulare Glykoprotein für die Uroprotein-Ausscheidung bei Paraproteinosen charakteristisch ist, da es bei Normalpersonen und bei Patienten mit Proteinurien anderer Genese nicht gefunden wurde. Die besondere Eigenschaft dieses Glykoproteids und seine Sonderstellung unter den Mucoiden und Glykoproteiden gab Veranlassung zu umfangreichen biochemischen Untersuchungen, über die hier berichtet werden soll.

Methodik

Zur Isolierung von 500 mg reinem Glykoprotein wurden insgesamt 10 l Urin von einer Patientin mit Plasmocytom nach folgender Methode aufgearbeitet:

1. Zentrifugation und Entfärben des Urins mit Tierkohle, Zugabe von 1:50 000 Merthiolat, 24 Stdn. erschöpfende Dialyse des filtrierten Urins gegen fließendes Wasser und anschließend gegen Aqua dest.
2. Abtrennung des proteinreichen und kohlenhydratarmen Bence Jones'schen Eiweißkörpers („BJE I“) durch Erhitzen auf 55° bis 65° bei pH = 6,5. Sofortiges Zentrifugieren und anschließende Filtration des Urins.
3. Erhitzen des Filtrates auf 70° bei pH = 8, 10 Min. Abzentrifugation eines koagulierten Uroproteins („BJE II“), das kohlenhydratreicher ist als BJE I.
4. Filtration des Überstandes und Zentrifugation bei 17 000 U/Min. Gefriertrocknung des wasserklaren Überstandes und anschließende Trocknung über Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz. Extraktion dieses kohlenhydratreichen, lipidhaltigen, proteinarmen Uroprotein-Komplexes („PRU II“) 12 Stdn. mit absolutem Methanol und 12 Stdn. mit Chloroform-Methanol (2:1) im Soxhlet-Verfahren.
5. Aufschlammung des trockenen, lipidfreien Extraktionsrückstandes in Aqua dest., mehrfaches Waschen mit Aqua dest. und Zentrifugation. Der klare, filtrierte Überstand enthält das niedermolekulare Glykoprotein in Lösung. Dialyse der wäßr. Glykoprotein-Lösung gegen Aqua dest., Gefriertrocknung und anschließende Trocknung über Phosphorpentoxid. Erhitzen der 1proz. wäßr. Glykoprotein-Lösung, die aus der Trockensubstanz angesetzt wurde. Erhitzungsdauer 5 Min.; pH = 5; 100°. Anschließend Zentrifugation bei 17 000 U/Min. Erneute Dialyse des Überstandes, Gefriertrocknung und Trocknung über Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz.

¹⁾ Mol.-Gew. korrigiert nach Asche-Bestimmung.

Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt

1. Elektrophorese

a) *Papierelektrophorese* mit horizontaler Trenntechnik in verschiedenen Puffersystemen: Veronal-Natrium pH = 8,6; Pyridin: Essigsäure:Wasser = 100:10:890, pH = 6,4; Pyridin:Essigsäure:Wasser = 30:50:900, pH = 4,6; Pyridin:Essigsäure:Wasser = 10:100:890, pH = 3,6; Ameisensäure:Pyridin:Wasser = 160:88:752, pH = 3,3 (5). Auftragsmenge pro Papierstreifen 1 mg, Laufzeit 4–6 Stdn., 220 V, 10 mA pro Papierstreifen. Zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes wurde nach Festlegung des groben pH-Bereiches zwischen 4,6 und 3,3 das pH stufenweise reduziert. Die Anfärbung erfolgte für die Proteine mit Amidoschwarz 10 B, die freien Aminogruppen wurden mit einem 2proz. Ninhydrin-Butanol-Spray dargestellt. Der Nachweis reduzierender OH-Gruppen wurde mit Anilinphtalat, p-Anisidinphthalat und alkalischer Silbernitratlösung vorgenommen. Außerdem wurden die Zucker und Aminosucker noch mit Perjodat-Benzidin identifiziert. Die Glykoprotein-Färbung wurde mit der PAS-Reaktion durchgeführt.

b) *Agarelektrophorese* mit der LKB-Apparatur: 1proz. Lösung von Agar (Difco „Noble“); Natrium-Veronalpuffer pH = 8,6; Auftragsmenge 14 ml pro Rahmensektion; Auftragsmenge der Substanz 0,008 mg; Trennzeit 90 Min., 250 V 8 mA Rahmensektion. Vergleich mit gepooltem Kontrollserum von 20 gesunden Blutspendern. Amidoschwarz- und PAS-Färbung.

c) *Stärke-Elektrophorese* nach SMITHIES, modifiziert nach KUNKEL: Doppel-Puffer A) Tris-Citronensäure, pH = 8,9 nach POULIK; B) Borsäure-NaOH, pH = 8,5, 15proz. Stärke-Gel (Serva-Entwicklungslabor Heidelberg). Trennung Puffer A: 550 V, 3 Stdn. Puffer B: 600–550 V, 3 Stdn.; Kammertemperatur — 3°. Färbung mit Amidoschwarz und Supracenviolet 3 B, Trichloressigsäure. Letztere erlaubt die photometrische Registrierung mit dem Extinktionsschreiber (Fa. Zeiss) analog zu den Papierelektrophorese-Diagrammen (6).

2. Immunologische Untersuchungen mit der Immuno-Elektrophorese nach SCHEIDEGGER (7) und Technik nach OSSERMANN (8). Zweidimensionale Diffusion im Agar-Gel nach OUCHTERLONY (9).

3. Die Ultrazentrifugen-Untersuchungen wurden mit dem Modell Spinco E vorgenommen (Rotor AN-D, Standardzelle 12 mm 4° und Überschichtungszelle SBCT, Temperatur 20° und 25°; Philpot-Svensson-Optik; keine Korrektur des Johnston-Ogston-Effektes).

4. Die Molekulargewichts-Bestimmung konnte mit der Ultrazentrifuge nach Kombination von Sedimentations- und Diffusionsläufen quantitativ durchgeführt werden (10). Die orientierende Molekulargewichtsbestimmung wurde in Diffusionszellen nach der Methode von NORTHRUP und ANSON (11) vorgenommen. Als Vergleichsprotein wurde Albumin in Lösung mit gleicher Konzentration verwendet.

5. Hydrolyse-Verfahren. Die chromatographische und chemische Bestimmung der einzelnen Konstituenten machte beim Vorliegen von Hexosen, Methylpentosen, Aminosackern, Neuraminsäure und Aminosäuren die Anwendung zahlreicher sowohl robuster als auch schonender Methoden zur Hydrolyse erforderlich.

a) *Aminosäuren*: Zur papierchromatographischen Darstellung der Aminosäuren wurde mit 4N HCl 4 Stdn. 100° unter Luftabschluß hydrolysiert. Die Salzsäure wurde in der Wärme im Stickstoffstrom abgedampft. Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren wurde 24 Stdn. in 6N HCl unter Stickstoff-Atmosphäre bei 105° in zugeschmolzenen Röhrchen hydrolysiert.

b) *Kohlenhydrate*: Zur Darstellung der Kohlenhydrat-Komponenten wurde das niedermolekulare Glykoprotein sowohl mit 80proz. Ameisensäure 2 und 4 Stdn. bei 100°, mit 50proz. Trichloressigsäure 4 Stdn. bei 100°, mit 4N HCl 4 Stdn. bei 100° und mit 4N H₂SO₄ 4 Stdn. bei 100° hydrolysiert. Die Salzsäure, die Ameisensäure und die Trichloressigsäure wurde durch Abdampfen

im Stickstoffstrom bei 70° entfernt. Schwefelsäure wurde durch Bariumhydroxyd in der Hitze als Bariumsulfat gefällt. Nach Entfernung der Säuren wurden Lösungen des hydrolysierten Glykoproteids zur chemischen und chromatographischen Untersuchung hergestellt. Neben diesen Säurehydrolysen wurden Kombinationshydrolysen mit 80proz. Ameisensäure 2 Stdn. und — nach Entfernung der Ameisensäure — eine 2-stdg. Hydrolyse mit 4*N* HCl vorgenommen. Außerdem wurde nach 2-stdg. Hydrolyse mit 80proz. Ameisensäure nach Entfernung dieser Säure 2 Stdn. mit 50proz. Trichloressigsäure bei 100° 2 Stdn. hydrolysiert.

c) *Partielle Hydrolyse*: Zur partiellen Abtrennung der Kohlenhydratkomponenten und zur Ermittlung der Stabilität der Kohlenhydratbindung wurde mit Ionenaustauscher Amberlite IR 120, 50—100 Mesh in H-Form bei verschiedenem pH und verschiedenen Temperaturen hydrolysiert; im Anschluß daran wurde gegen Aqua dest. dialysiert. 60 mg Substanz wurden in kleinstmöglicher Menge Wasser gelöst und mit der dreifachen Menge analysenfertigen Ionenaustauschers im Hydrolyseröhrchen gut vermischt. Nach 3 Stdn. bei 20° wurde das Substanz-Ionenaustauscher-Gemisch in einen Dialyseschlauch gebracht und 2 Tage gegen Aqua dest. ausreichend dialysiert. Die Gesamtkohlenhydrate wurden im Dialysat und Dialyserückstand chemisch und chromatographisch untersucht. Mit dem gleichen Versuchsansatz wurde dann bei pH = 5, 100° 3 Stdn. und anschließend bei pH = 1, 3 Stdn. und 100° hydrolysiert und danach dialysiert. Da bei allen Stufen der Ionenaustauscher-Hydrolyse im Dialysat, Dialyserückstand und nach Elution des Ionenaustauschers mit H₂O keine Hexosamine nachweisbar waren, wurden die Hexosamine mit 0,2*N* HCl im Anschluß an die Hydrolyse bei pH = 1, 3 Stdn. 100° eluiert. Die Dialysate und Eluate wurden im Rotationsverdampfer bei 40° zur Trocknung gebracht und 1 g-proz. Lösungen davon angesetzt.

6. Chemische Untersuchungen. Die chemischen Untersuchungen des Glykoproteids wurden in der eingewogenen Trockensubstanz und in aliquoten Teilen des mit Säure- oder Ionenaustauscher hydrolysierten Glykoproteids ausgeführt.

a) Quantitative *Aminosäuren*-Bestimmungen wurden nach Hydrolyse mit dem Amino-Acid-Analyser Modell 120 nach der Methode von STEIN und MOORE (12) vorgenommen.

b) Die *Hexosen* wurden mit der Anthron- und Orcin-Methode bestimmt. Die Extinktionswerte wurden auf einen Glukose-, Galaktose-, Mannose-Standardwert bezogen.

c) Die *Methylpentosen* wurden nach DISCHE und SHETTLES (13) mit der Cystein-Hydrochlorid-Methode bestimmt.

d) Die *Neuraminsäure* wurde nach SVENNERHOLM (14) mit der Resorcin-Methode ermittelt. Hierbei konnten wir entsprechend der Originalvorschrift durch 15 Min. Erhitzen auf 100° mit Resorcin-Salzsäure die Neuraminsäure nicht vollständig aus dem eingewogenen Glykopolypeptid abspalten. Es wurde deshalb die Resorcin-Methode nach vorausgegangener Hydrolyse mit 40proz. Ameisensäure 30 Min. und nach Ionenaustauscher-Hydrolyse durchgeführt. Außerdem wurde die Neuraminsäure-Bestimmung mit Variation der Erhitzungszeit der Resorcin-Methode vorgenommen (15, 30, 60 und 120 Min.).

e) Die *Hexosamin*-Bestimmung wurde nach ELSON-MORGAN (15) ausgeführt.

f) Der *Gesamtstickstoff* wurde nach KJELDAHL und nach DUMAS ermittelt. Hieraus wurde nach Abzug des Stickstoffes der Aminosucker der Polypeptidgehalt errechnet.

g) Die *Polypeptid*-Bestimmung wurde mit der Biuret-Methode vorgenommen.

h) Die *Elementar-Analyse* wurde in üblicher Weise durchgeführt.

7. Chromatographie

a) *Aminosäuren und Aminosucker*: Die Aminosäuren und Aminosucker wurden nach Durchführung der oben beschriebenen Hydrolysen mit 4*N* HCl eindimensional auf Whatman-Papier Nr. 1, absteigend in Lösungsmitteln Butanol:Pyridin:Wasser = 1:3:5 getrennt. Nach 18 Stdn. wurde das Chromatogramm getrocknet und erneut in demselben Lösungsmittel 12 Stdn. chromatographiert.

Die zweidimensionale Trennung erfolgte aufsteigend mit den Lösungsmitteln: 1. Phase — Butanol:Eisessig:Wasser = 480:120:200; 12 Stdn. 2. Phase — 90% Phenol + 1% Ammoniak; 8 Stdn. (5).

Die Chromatogramme wurden mit 2proz. Ninhydrin-Butanol-Spray bei 110° innerhalb von 10 Min. entwickelt. Die Auftragsmenge zur Aminosäuren- und Aminosucker-Trennung betrug 50—80 µg hydrolysiertes Glykoprotein.

b) *Gesamtkohlenhydrate*: Hexosen, Methylpentosen, Aminosucker und Neuraminsäure wurden nach Hydrolyse ebenfalls auf Whatman-Papier I mit der gleichen Technik absteigend chromatographiert. Die Auftragsmenge betrug 150—180 µg Glykoprotein. Außerdem wurde die Dünnschichtchromatographie auf MN-Cellulose 30 G unter Verwendung des gleichen Lösungsmittels ausgeführt. Die Trennzeit betrug hierbei 2—3 Stdn.; Auftragsmenge 5—10 µg Substanz. Zum Nachweis der Zucker und Aminosucker wurde Anilinphthalat oder p-Anisidinphthalat für Papier- und Dünnschichtchromatogramme als Spray verwandt (16). Außerdem wurden auf Papier die reduzierenden OH-Gruppen mit alk. Silbernitrat sichtbar gemacht. Zur Identifizierung der Neuraminsäure wurde noch zusätzlich Perjodat-Benzidin-Spray (5) benutzt. Die quantitative papierchromatographische Trennung der Hexosen, Methylpentosen und Aminosucker wurde nach Auftrag von 25 mg hydrolysierte Substanz nach Ionenaustauscher-Hydrolyse vorgenommen. Hierbei wurde das im Vakuum-Verdampfer eingedampfte Dialysat über 25 cm Papierbreite punktförmig aufgetragen und in der üblichen Weise chromatographiert. Nach Identifizierung der Zucker in den abgetrennten Randpartien mit Anilinphthalat wurden die Papierzonen der einzelnen Zucker herausgeschnitten und mit H₂O eluiert. Durch Rechromatographie wurde die Reinheit der Zuckertrennung überprüft. Danach wurden die Hexosen mit der Anthron- und Orcin-Methode in den Eluaten bestimmt. Die Extinktionswerte wurden auf einen speziellen Zuckerstandard der jeweils in Frage kommenden Zuckerart bezogen. Die Methylpentosen wurden mit der Cystein-Hydrochloridmethode von DISCHE und SHETTLES ermittelt. Die eluierten Aminosucker wurden nach ELSON-MORGAN bestimmt. Außerdem wurden die getrennten Aminosucker noch mit Silbernitrat entwickelt und die Aminosucker-Banden photometrisch mit dem Extinktionsschreiber (Fa. Zeiss) als Diagramm dargestellt und planimetrisch ausgewertet (17). Die Aminosucker, die durch Ninhydrin-Reagenz zur Darstellung der freien Aminogruppe und mit Anilinphthalat und alkalischer Silbernitratlösung zum Nachweis reduzierender OH-Gruppen identifiziert worden waren, wurden spezifisch nach Ninhydrin-Abbau durch die dabei entstehenden nächstniederen Pentosen chromatographisch identifiziert (18). Der Ninhydrin-Abbau wurde mit einer 2proz. Ninhydrin-Konzentration in 4proz. Pyridin in zugeschmolzenen Kapillaren über 50 Min. bei 100° ausgeführt. Die Substanz-Einwaage betrug 20 mg; Glukosamin wurde zu Arabinose und Galaktosamin zu Lyxose abgebaut.

8. Infrarotspektren

Die Infrarotspektren wurden mit dem Gerät nach Perkin-Elmer im Kaliumbromid-Preßling aufgenommen.

9. Fermentativer Glukosenachweis

Die Glukose wurde fermentativ nach Säurehydrolyse und Ionenaustauscher-Hydrolyse mit der Glukoxydase-Reaktion (19) und durch den Umsatz von TPN durch Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu TPN-H nachgewiesen (20).

Ergebnisse

Aus dem Urin von Plasmocytom-Kranken mit positiver Bence Jones'scher Eiweißkörper-Ausscheidung isolierten wir ein relativ niedermolekulares Glykoprotein. Die Konzentration im Urin beträgt 40—50 mg%; es ist in Wasser hitzestabil und gut löslich. In 0,6*M* Perchlorsäure ist es ebenfalls leicht löslich, jedoch nicht in 10proz. Trichloressigsäure. In der Ultrazentrifuge, bei

der Papier- und Stärke-Gel-Elektrophorese ist es bei pH = 7–8,5 homogen (Abb. 1). In der Immuno-elektrophorese zeigen sich zwei feine Präzipitationslinien, die ebenfalls im α_1 -Globulin-Bereich liegen und partielle Antigen-Gemeinschaft gegenüber Antihuman-serum vom Kaninchen aufweisen (Abb. 2). Der iso-

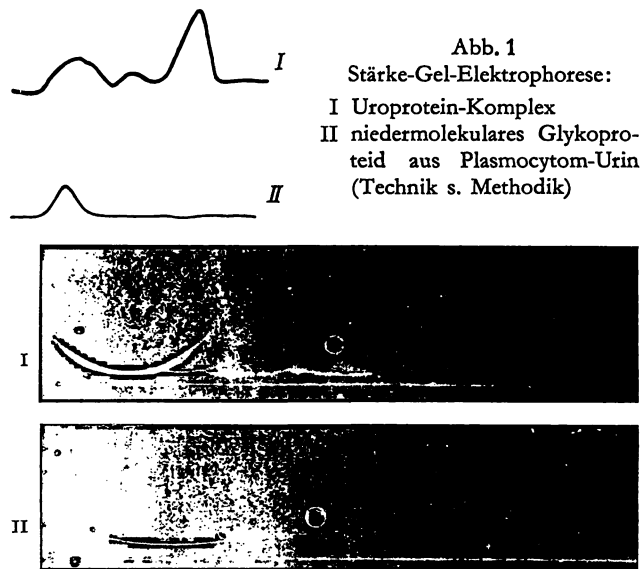


Abb. 2

Immunoelktrophorese: I Gesamturoprotein, II niedermolekulares Glykoprotein (Technik s. Methodik)

elektrische Punkt liegt zwischen 3,6 und 3,3. Das Molekulargewicht wurde mit der kombinierten Sedimentations- und Diffusionsmessung nach SVEDBERG in der Ultrazentrifuge bestimmt und betrug $19900 \pm 3\%$. Die S_{20}^0 -Konstante ist $1,43 \times 10^{-13}$. Die orientierende Molekulargewichtsbestimmung durch Diffusionsmessung nach NORTHUP und ANSON ergab ein Molekulargewicht um 15 000 (Tab. 1).

Tab. 1

Molekulargewichtsbestimmung des Glykoproteids nach SVEDBERG und NORTHUP und ANSON (Mol.-Gew. ohne Berücksichtigung des Asche-Gehaltes)

Molekulargewichtsbestimmung nach SVEDBERG:

Sed. Geschw.-Messungen

Konz. %	U/Min.	Sed. Koeff. (in SVEDBERG-Einheit)	Sed. Konstanten (in SVEDBERG-Einheit)
1,036	50 740	$1,48 \times 10^{-13}$	
0,617	50 740	$1,42 \times 10^{-13}$	$1,429 \times 10^{-13}$
0,408	50 740	$1,47 \times 10^{-13}$	

Diff. Geschw.-Messungen

Konz. %	U/Min.	Diff. Koeff.	Diff. Konstante
1,036	4609	$5,49 \times 10^{-7}$	
0,670	4609	$5,87 \times 10^{-7}$	$6,85 \times 10^{-7}$
0,408	4609	$6,42 \times 10^{-7}$	

Molekulargewichtsbestimmung nach NORTHUP und ANSON:

Mol.-Gew. 15 000

Polypeptid-Anteil

Der Gesamt-N-Gehalt des Glykoproteids, bestimmt nach KJELDAHL, betrug 8,9. Hieraus läßt sich unter Abzug des N-Gehaltes der Aminosucker der Peptid-Anteil berechnen; er beträgt 57%. Das entspricht dem Wert, der auch mit der Biuret-Methode ermittelt wurde. Nach Hydrolyse mit 4*N* HCl 4 Stdn. 100° konnten im zweidimensionalen Chromatogramm 16 verschiedene Aminosäuren mit Ninhydrin identifiziert werden, wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist. Methionin war nicht nachweisbar. Bei der quantitativen Aminosäure-Bestimmung nach der Methode von STEIN und MOORE (12) wurden die 16 Aminosäuren erfaßt, deren prozentuale Verteilung im Vergleich zu den Werten des Bence Jones'schen Proteins und des Gesamturoprotein-Komplexes aus Abbildung 4 zu ersehen ist. Im Gegensatz zu dem Gesamtkomplex und dem Bence Jones'schen Eiweißkörper war das Glykoprotein methioninfrei (21, 22). Im Vergleich mit dem Gesamturoprotein ist eine Zunahme von Prolin, Alanin, Valin und Tyrosin und eine Abnahme von Asparaginsäure, Arginin, Glycin, Leucin, Cystein und Phenylalanin festzustellen. In Gegenüberstellung zu dem BJE findet man eine Zunahme bei Prolin, Alanin, Cystein und eine Abnahme bei Arginin, Asparaginsäure, Glycin, Leucin, Phenylalanin und Serin.

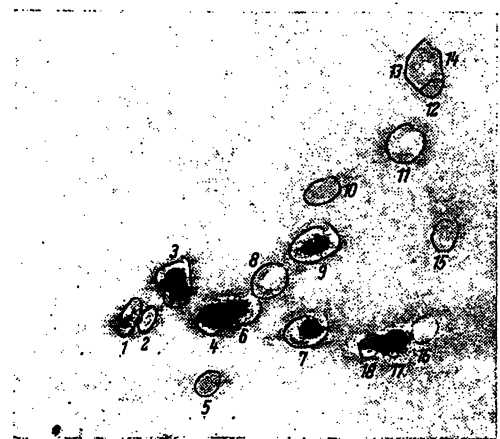


Abb. 3

Aminosäurechromatogramm des niedermolekularen Glykoproteids. Hydrolyse: 4 Stdn. 4*N* HCl, Papier: Whatman I, Lösungsmittel A) Butanol:Eisessig:Wasser = 480:120:200, 12 Stdn.; B) 90proz. Phenol und 1proz. Ammoniak, 8 Stdn., Auftragsmenge 60 µg, Entwickler 2proz. Ninhydrin/Butanol als Sprühmittel; Erhitzen 10 Min., 110°.

- | | | |
|--------------------|-------------------|----------------|
| 1 = Cystein | 7 = Glukosamin | 13 = Leucin |
| 2 = Asparaginsäure | 8 = Threonin | 14 = Isoleucin |
| 3 = Glutaminsäure | 9 = Alanin | 15 = Prolin |
| 4 = Serin | 10 = Tyrosin | 16 = Arginin |
| 5 = Galaktosamin | 11 = Valin | 17 = Lysin |
| 6 = Glycin | 12 = Phenylalanin | 18 = Histidin |

Gesamtkohlenhydrate

Die Gesamtkohlenhydrate wurden sowohl direkt mit den Zuckerreagenzien als auch nach Hydrolyse der Substanz mit verschiedenen Säuren oder Ionenaus-

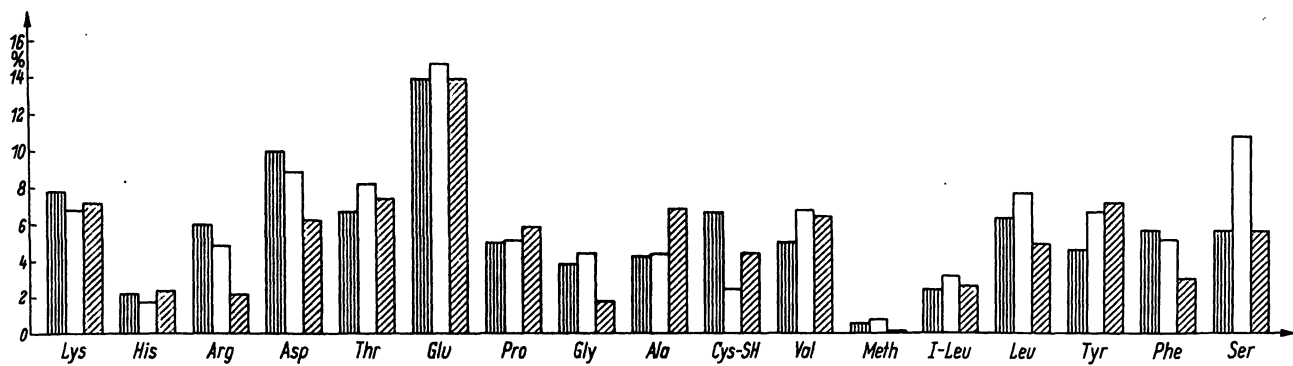


Abb. 4

Prozentuale Aminosäureverteilung im Polypeptidanteil des Gesamturoproteins , des Bence Jones'schen Eiweißkörpers und des niedermolekularen Glykoproteids

tauscher bestimmt. Die Ausbeute an einzelnen Zuckern war bei den Säurehydrolysen sehr unterschiedlich und ist aus Tabelle 2 zu ersehen. Glukose und Hexosamine wurden mit Salzsäure am besten abgespalten. Ameisensäure und Trichloressigsäure bewirkten eine gute Ausbeute an Methylpentosen; Schwefelsäure war für Hexosen und Methylpentosen am geeignetsten, obgleich die Kohlenhydratgesamtausbeute etwas niedriger lag. Wie erwartet hydrolysierte die Schwefelsäure nur einen geringen Prozentsatz an Hexosaminen. Neuraminsäure konnte von den verwendeten Säuren nur mit Ameisensäure hydrolysiert werden, ohne daß das Molekül zerstört wurde. Die optimale Ausbeute an Kohlenhydraten nach Hydrolyse mit verschiedenen Säuren zeigt, daß die Werte für Hexosamine, Neuraminsäure und Glukose höher liegen, als nach den Untersuchungen mit der eingewogenen Substanz zu erwarten war. Da nach Säurehydrolysen die chromatographische Trennung der Zucker durch Spuren von Säure, die sich nicht mehr entfernen ließen, gestört war, verwendeten wir noch die sehr schonende Methode einer stufenweisen Hydro-

lyse der Kohlenhydrat-Komponenten mit Ionenaustauscher. Durch Änderung des pH und der Temperatur konnte mit saurem Ionenaustauscher IR 120 50–100 Mesh das Glykoprotein in mehreren Versuchsansätzen hydrolysiert werden. Die in den einzelnen Hydrolysestufen abgespaltenen Komponenten konnten durch Dialyse wiedergewonnen werden. Diese Hydrolysebedingungen erlauben einen Rückschluß auf die Stabilität der Kohlenhydratbindungen im Glykoprotein. Wir fanden mit dieser Methode einen Gesamtkohlenhydratgehalt von 38,1%, der aus 16,6% Hexosen, 4,5% Methylpentosen, 10,2% Hexosamin und 6,8% Neuraminsäure besteht. Neuraminsäure konnte schon bei Zimmertemperatur und pH = 5 teilweise abgespalten werden. Die Gesamtausbeute der Kohlenhydrate liegt etwas höher als bei den Säurehydrolysen. Die chromatographische Trennung der dialysierten Hydrolysate ergab Galaktose, Glukose, Mannose, Fucose, Rhamnose, Glukosamin, Galaktosamin und Neuraminsäure. Paralleluntersuchungen mit der Dünnschichtchromatographie auf MN-Cellulose erlaubten bei sehr guter Trennzeit in

Tab. 2

Vergleich der Kohlenhydratuntersuchungen, ausgeführt mit Glykoprotein direkt mit den Zuckerreagenzien nach Säure- und Ionenaustauscher-Hydrolyse

N = Gesamtstickstoff (KJELDAHL); An = Anthron-Reaktion; Or = Orcin-Reaktion; Glu = Glukose, fermentativ bestimmt; HA = Hexosamine nach ELSON-MORGAN; NS = Neuraminsäure nach SVENNERHOLM; Ges.KH = Gesamtkohlenhydrate; Ges.% = Gesamt-Prozent

Untersuchungsmaterial	N	An	Or	Glu	Methylpentosen	HA	NS	Ges.KH	Ges.%
Glykoprotein K _Ö A, Substanz	8,9	19	24,2	0,6	3,4	7,5	1,3	37,0	91,4
Glykoprotein hydrol. 4 Stdn. 4 <i>N</i> HCl 100°		13	16,1	1,3	2,1	11,0	0,2	27,3	84,0
Glykoprotein hydrol. 4 Stdn. 80proz. HCOOH 100°		14	15,8	1,3	2,5	3,7	4,0	23,5	80,0
Glykoprotein hydrol. 4 Stdn. 50proz. CCl ₃ COOH 100°		19	23,0	1,3	3,6	8,5	0,7	32,5	88,0
Glykoprotein hydrol. 4 Stdn. H ₂ SO ₄ 100°		14	10,0	0,1	3,0	0,9	0,5	15,4	72,0
Optimale Ausbeute nach Säurehydrolyse		19	24,2	1,3	3,6	11,0	4,0	39,2	96,0
Ausbeuten nach Ionenaustauscher-Hydrolysen mit Amberlite pH = 5 und pH = 1		23,6	23,6	4,5	4,1	11,2	3,0	40,3	97,3

kleinen Auftragsmengen häufige, schnell orientierende Kontrolluntersuchungen.

Die partielle Ionenaustauscher-Hydrolyse zeigte, daß etwa 2% Hexosen, 1% Methylpentosen, 2% Neuraminsäure bei 20° pH = 5 nach 3 Stdn. abgespalten wurden und durch Dialyse zu isolieren waren. 13% Hexosen, 2,5% Pentosen und 2,5% Neuraminsäure wurden erst nach 2-stdg. Ionenaustauscher-Hydrolyse pH = 5, 100° erhalten. Die restlichen Hexosen und Methylpentosen wurden nach 3-stdg. Hydrolyse pH = 1, 100° freigesetzt, wobei der Prozentsatz der Glukose am höchsten lag. Die Hexosamine hafteten an dem Austauscherkorn und wurden mit 0,2*N* HCl eluiert. Die Ausbeute betrug 10,2%. Die restliche Neuraminsäure befand sich nach Hydrolyse pH = 5, 100° noch im Dialyserückstand, bei Hydrolyse pH = 1, 100° wurde sie zerstört. — Zur quantitativen Darstellung der einzelnen Zuckerkomponenten wurden die Dialysate und das 0,2*N* HCl-Eluat nach Austauscher-Hydrolyse auf einem 25cm breiten Chromatogrammbogen mit einer Auftragsmenge von 25 mg aufgetragen und chromatographiert (Abb. 5). Nach Identifizierung

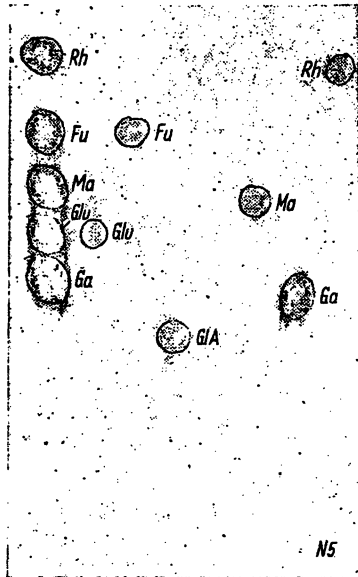


Abb. 5

Chromatogramm der papierchromatographisch getrennten und eluierten Zucker des Glykoproteids nach Ionenaustauscher-Hydrolyse mit Amberlite IR 120, 50–100 Mesh, pH = 5 und pH = 1, 100°, 3 Stdn.; Lösungsmittel Butanol:Pyridin:Wasser = 1:3:5, 18 Stdn., danach Trocknung, erneute Chromatographie in demselben Lösungsmittel 12 Stdn.

Ga = Galaktose	Rh = Rhamnose
Glu = Glukose	NS = Neuraminsäure
Ma = Mannose	GlA = Glukosamin
Fu = Fucose	

und Elution der einzelnen Zuckerzonen wurde in den Eluaten der Galaktose, Glukose, Mannose, Rhamnose und Fucose mit der Orcin- und Anthron-Methode die Kohlenhydrat-Konzentration bestimmt. Die Extinktionswerte wurden auf den jeweiligen Zuckerstandard bezogen. Die Fucose- und Rhamnose-Konzentrationen wurden außerdem nach DISCHE und SHETTLER (13) ermittelt, die Glukose wurde mit der Glukoxydase (19)

und Hexokinase-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (20) fermentativ bestimmt. Glukosamin und Galaktosamin wurden mit der ELSON-MORGAN-Reaktion (15) ermittelt. Außerdem wurde das Verhältnis der Aminosucker nach Entwicklung des Chromatogrammes mit alk. Silbernitrat photometrisch dargestellt und planimetrisch ausgewertet (17). Neben der quantitativen Aminozucker-Bestimmung und chromatographischen Identifizierung des Glukosamins und Galaktosamins wurden die Hexosamine durch Ninhydrin-Abbau zu den entsprechenden Pentosen Arabinose (Glukosamin) und Lyxose (Galaktosamin) abgebaut und identifiziert (18). Das Vorliegen von Mannosamin, welches ebenfalls durch Ninhydrin zu Arabinose umgesetzt wird, konnte chromatographisch ausgeschlossen werden. Die Neuraminsäure konnte bei Anwendung der Resorcin-Methode nach SVENNERHOLM (14) aus der eingewogenen Glykoprotein-Substanz nur mit 1,2% erfaßt werden. Nach Verlängerung der Versuchsdauer von 15 Min. auf 60 Min. lag die Ausbeute bei 2%. Nach vorausgegangener Hydrolyse mit Ameisensäure war eine Ausbeute von 4% zu erzielen. Im Dialysat nach Ionenaustauscher-Hydrolyse bei pH = 5, 20° und 100° fanden wir 4%. Der Rest der Neuraminsäure war in dem Dialysat-Rückstand mit der Resorcin-Methode nachweisbar und dürfte noch nicht aus dem Molekülverband freigesetzt worden sein, da sie nicht dialysierte. Nach Ionenaustauscher-Hydrolyse pH = 1, 100° konnten wir zusammen mit den Aminosuckern praktisch alle Aminosäuren chromatographisch nachweisen, die wir auch nach der Hydrolyse des Glykoproteids mit 4*N* HCl 4 Stdn., 100° erhalten hatten. Hieraus ist zu erkennen, daß trotz schonender Hydrolyse infolge großer Oberflächenwirkung eine weitgehende Spaltung des Glykoproteids stattgefunden hatte, die annehmen läßt, daß sämtliche Kohlenhydrat-Komponenten abgespalten worden waren. Die gefundenen 38,1% der Gesamtkohlenhydrate haben folgende prozentuale Verteilung im Glykoprotein: Ga:Ma:Glu:Fu:Rh:GlA:GaA:NS = 8,1:4,5:4,0:3,2:1,3:8,4:1,8:6,8, mit einer molaren Verteilung von 10:5:5:4:2:8:2:5. Das Verhältnis Galaktose:Mannose beträgt 2 (Tab. 3).

Elektrophoretische Untersuchungen

Elektrophoretische Untersuchungen des Glykoproteids zeigten bei pH = 7–8,5 auf Papier, in Stärke und Agar-Gel eine homogene Bande, die mit der Geschwindigkeit der α_1 -Globuline wanderte. Sie war mit Ninhydrin, PAS, Anilinphthalat, alk. Silbernitrat und Amidoschwarz darzustellen. Die Anfärbung mit Amidoschwarz war sehr schwach. Neben dem Glykoprotein-Charakter ist daraus zu erkennen, daß reduzierende OH-Gruppen endständig sein müssen.

Infrarotspektrum

Das Infrarotspektrum entsprach dem bereits chemisch, chromatographisch und elektrophoretisch nachgewiesenen Glykoproteincharakter. Der Kurvenverlauf ist

Tab. 3
Prozentuale Verteilung der Kohlenhydrate bei Glykoproteiden und Mucoiden des Serums und Urins

Material	Ga	Ma	Ga/Ma	Glu	Fu	Rh	Rib	Hex	NS	Ges.KH
α_1 -Serum Mucoid ¹⁾	9,8	4,9	2	—	0,7	—	—	13,9	12,1	41,4
Haptoglob. 1—1 ¹⁾	5,2	2,6	2	—	0,2	—	—	5,3	5,3	18,6
Haptoglob. 2—1 ¹⁾	4,2	2,1	2	—	0,18	—	—	5,9	3,1	15,5
Haptoglob. 2—2 ¹⁾	3,6	1,8	2	—	0,18	—	—	5,5	3,4	14,5
Transferrin ¹⁾	1,6	0,8	2	—	0,07	—	—	2,0	1,4	5,9
Coeruloplasmin ¹⁾	1,5	1,5	1	—	0,18	—	—	2,4	2,2	7,8
α_2 -Makroglobulin ¹⁾	1,8	1,8	1	—	0,12	—	—	2,9	1,8	8,4
β_2 A-Globulin ¹⁾	1,6	1,6	1	—	0,22	—	—	1,8	1,8	7,0
γ -Makroglobulin ¹⁾	1,5	3,0	0,5	—	0,70	—	—	4,4	1,3	10,9
normales Harnmucoid ²⁾	5,43	4,37	1,3	2,99	1,3	0,52	0,62	8,4	2,0	25,6
niedermolekulares Glykoprotein aus Plasmocytom-Urin ³⁾	8,1	4,5	1,8	4,0	3,2	1,3	—	8,4	6,8	38,1

1) SCHULTZE, H. E. 2) KING JR., St. J. und Mitarbeiter. 3) Eigene Untersuchungen.

dem Infrarotspektrum des normalen Harnmucoides ähnlich (Abb. 6), obgleich die Aminosäure-Zusammensetzung und die Verteilung der Gesamtkohlenhydrate deutliche Differenzen erkennen lassen (Tab. 4).

Die prozentuale Zusammensetzung des Glykoproteids und die molare Verteilung der Aminosäuren und Kohlenhydrate erlauben eine Berechnung des Molekulargewichtes, das in guter Übereinstimmung mit dem durch Sedimentations- und Diffusionsläufen in der Ultrazentrifuge gefundenen Molekulargewicht steht. Auf Grund der molaren Verteilung (Tab. 4) sind in dem Glykoprotein 775 C-, 1267 H-, 392 O-, 156 N- und 6 S-Atome anzunehmen. Aus den Ergebnissen mehrfach wiederholter Elementaranalysen, nämlich C = 47,0%; H = 6,75%; N = 10,8%; S = 1,0% und dem mit der Ultrazentrifuge bestimmten Molekulargewicht von 19 900 konnten wir für das Glykoprotein 779 C-, 1343 H-, 428 O-, 153 N- und 6 S-Atome berechnen. Die gute Übereinstimmung in der Zahl der C-, N- und S-Atome berechtigt zu der Annahme, daß wir alle wesentlichen Aminosäure- und Kohlenhydratkomponenten des Protein-Symplexes mit den durch-

Tab. 4

Prozentuale und molare Verteilung der Aminosäuren und Kohlenhydrate im niedermolekularen Glykoprotein des Plasmocytom-Urins und im normalem Harnmucoid¹⁾ (KING JR., St. J. u. Mitarb.)

	Prozentuale Verteilung der AS und KH im Glyko- protein	Molare Verteilung der AS und KH im Glyko- protein	Prozentuale Verteilung der AS und KH im nor- malen Harn- mucoid	Molare Verteilung der KH im normalen Harn- mucoid
Lys	4,6	7	2,508	
His	1,5	2	1,932	
Arg	1,4	2	3,948	
Asp	4,1	7	6,582	
Tr	4,9	10	4,132	
Ser	3,9	9	3,792	
Glu	9,1	14	6,161	
Pro	3,9	8	2,526	
Gly	1,2	4	2,762	
Ala	4,4	12	3,041	
Cys-SH	2,85	6	3,326	
Val	4,35	9	3,730	
Meth	—	—	1,524	
Ileu	1,7	3	1,972	
Leu	3,3	6	4,966	
Tyr	4,8	6	3,159	
Phe	2,0	3	2,675	
NH ₂	1,8	(21)	1,609	

Summe der AS in %	59,8%	108	Ges. %	58,737
Gal	8,1	10	5,43	8
Man	4,5	5	4,37	6
Glu	4,0	5	2,99	4
Fu	3,2	4	1,30	3
Rham	1,3	2	0,52	1
Rib	—	—	0,62	1
NA Glc-NH ₂	8,4	8	8,40	—
NA Gal-NH ₂	1,8	2	0,30	—
Sialins.	6,8	5	2,00	—
Summe der Ges. KH in %	38,1%	41	25,93	23

1) Berechnung der prozentualen und molaren Verteilung im Molekül unter Abzug von 146 H₂O bei insgesamt 142 AS und KH.

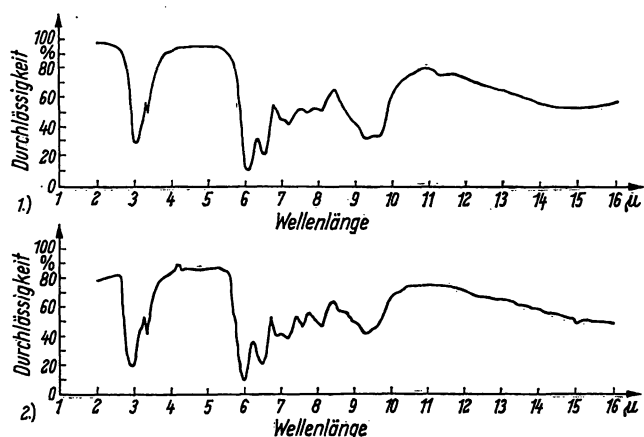


Abb. 6

Infrarotspektrum des Glykoproteids aus Plasmocytom-Urin (1) im Vergleich zu dem Infrarotspektrum des normalen Harnmucoids (2) (KING JR., St. J. und Mitarbeiter). Infrarotspektrophotograph Perkin Elmer; Kaliumbromid-Preßling

Tab. 5

Prozentuale Verteilung des Gesamtstickstoffes und der Kohlenhydrate bei Glykoproteiden und Mucoiden des Serums und Urins
 N = Gesamtstickstoff, E = Eiweiß, berechnet aus Gesamtstickstoff, B = Biuret-Wert, Hex = Hexosen, Ga = Galaktose, Ma = Mannose, Glu = Glukose, Fu = Fucose, Rh = Rhamnose, HA = Hexosamine, GlA = Glukosamin, GaA = Galaktosamin, NS = Neuraminsäure, Ges. KH = Gesamtkohlenhydrate, MG = Molekulargewicht, iP = isoelektrischer Punkt

Glycoproteide	Autoren	N	E	B	Hex	Ga	Ma	Ga/Ma	Glu	Fu	Rh	HA	GlA	GaA	NS	Ges.-KH	MG	iP	mg/100 ml Serum
α_1 -Globulin	¹⁾				7,5					0,55		6,3			4,1	18,5			
α_2 -Globulin	¹⁾				5,9					0,4		4,2			3,0	13,5			
β -Globulin	¹⁾				2,7					0,2		1,9			1,5	6,3			
γ -Globulin	¹⁾				1,9					0,3		1,5			1,2	4,9			
Serummucoid	¹⁾	10,9	68		14,3					1,0		10,0			9,0	34,3			
Orosomucoid	¹⁾	10,1		63	15,0			2		1,0		12,0			12,0	41,0	41 000	1,8—2,7	75
Orosomucoid	Easton J. A.	9,4		50	16,7										10,7				
Orosomucoid	Schmidt K.	10,7		66	17,2										10,6				
α_1 Glycoprotein 3,5 S	¹⁾ Schultze H. E.	13,3		84	6,8							3,6			3,3	13,7	54 000		30
α_2 Small Globulin	¹⁾	12,6		80	5,0							3,5			7,0	15,5	$S_{20} = 2,6$	3,85	
α_2 Makroglobulin	¹⁾ Schultze H. E.	14,8		92	3,6			1		0,12		2,3			1,8	7,8	$S_{20} = 19$		240
α_2 Makroglobulin	¹⁾ Brown			98	5,3							3,8					$S_{20} = 16,3$		240
α_2 Makroglobulin	¹⁾ Müller-Eberhard H. J.	14,2			4,8							2,7			2,3	9,8	$S_{20} = 19$		
Transferrin	¹⁾	15,4		95	2,4			2		0,07		1,6			1,4	5,5	88 000	5,9	400
Coeruloplasmin	¹⁾	13,8		95	3,0			2		0,18		1,9			2,0	7,1	151 000	4,4	30
Haptoglobulin	¹⁾	12,9		83	11,3			1		0,18		5,7			5,5	22,7	85 000	4,1	100
β_2 A-Globulin	¹⁾	16,2			4,9							3,7					$S_{20} = 7$		
γ -Globulin 7 _s	¹⁾	15,6		97	1,2			0,5		0,29		1,4			0,22	3,1	157 000		1480
γ -Globulin 19 _s	¹⁾	14,6			5,2					0,62		2,9			1,7	10,4	$S_{20} = 19$		
Makroglobulin	Metais				3,5					0,52		1,6			0,6	6,2			
Makroglobulin	Müller-Eberhard H. J.				4,85					0,62		2,66			1,71	9,84			
Makroglobulin β_2 M	Weicker, H. ¹⁾	14,0	88	80	4,5					0,61		2,2			1,4	8,6			
Myelom-Protein	¹⁾				08—04					0,62		2,7			1,71	9,9			
Cryoglobulin	Weicker, H.	11,0		75	2,3							3,0			0,8	6,1			
Urin-Mucoide	Tamm	11,0			6,8—					0,7—		8,4			7,3		7,10 ⁶		Urin
Urin-Mucoide	Horsfall				9,0					1,1					9,1				
Urin-Mucoide	King, jr. St. J.	11,0				5,4	4,4	1,2	2,99	1,30	0,52	8,4			2,0	25,6			
Urin-Glykoprotein normal	Tunis, M.			70	7,5							6,3			6,3	20,1			
Leukämie Fr. I	Tunis, M.			86	4,6							4,0			5,0	13,6			
Leukämie Fr. II	Tunis, M.			71	7,2							6,9			6,3	26,5			
Myeloische Leukämie Fr. I	Tunis, M.			68	8,2							7,8			8,0	24,0			
Myeloische Leukämie Fr. II	Tunis, M.			89	8,5							9,4			9,1	26,7			
Urin-Glykoprotein Frakt. I	Hakomori, S.			+	13,5	+			+	5,6		Ø			Ø	19,1			
Urin-Glykoprotein Frakt. II	Hakomori, S.			+	5,6				+	0,2		Ø			Ø	5,8			
Urin-Glykoprotein Frakt. III	Hakomori, S.			+	7,5	+			+	2,5		3,5	+	+	Ø	13,5			
Urin-Glykoprotein Plasmocytom	Weicker, H.	14,3	90	87	3,3							1,0			0,8	5,1	53 000		1070
Ges. Uroprotein																			
BJ-Hitzefällung	Weicker, H.	13,7	86	85	1,3							0,5			0,3	2,1	35 000		720
BJ-Ammoniumsulfatfällung	Weicker, H.	14,6	91,2	90	1,5							2,0			0,5	4,0	35 000		700
Glykoprotein niedermolekular	Weicker, H.	8,9	66	57	16,6	8,1	4,5	1,8	4,0	3,2	1,3	10,2	8,4	1,8	6,8	38,1	19 000	3,3	50
																	$S_{20} = 1,43$	3,6	

¹⁾ Zitiert nach WINZLER, R. J.

geführten Untersuchungen erfaßt haben. Das aus den 108 Aminosäuren und 41 Kohlenhydraten errechnete Molekulargewicht von 19215, verglichen mit dem in der analytischen Ultrazentrifuge ermittelten Molekulargewicht von 19900, stützt ebenfalls diese Annahme.

Diskussion

Das relativ niedermolekulare Glykoprotein, isoliert aus Plasmocytom-Urin, hat im wesentlichen die Eigenschaften, die für Perchlorsäure-lösliche Glykoproteide charakteristisch sind (23). Abweichungen zeigen sich jedoch sowohl in der Aminosäure- und Kohlenhydrat-Zusammensetzung als auch in den physiko-chemischen Untersuchungsergebnissen, die diesem Glykoprotein eine Sonderstellung unter den Perchlorsäure-löslichen Protein-Symplexen einräumen und seine Atypie kennzeichnen. Es ist in der horizontalen Papierelektrophorese und in der Stärke-Gel-Elektrophorese bei $\text{pH} = 7-8,5$ einheitlich. Die elektrophoretische Wanderung entspricht dem α_1 -Globulin. Der isoelektrische Punkt liegt zwischen 3,3–3,6. Die Immunelektrophorese zeigt eine partielle Antigen-Gemeinschaft der im Bereich der α_1 -Globuline lokalisierten Präzipitationslinien gegen Antihumanserum. Bei der Sedimentationsanalyse in der Ultrazentrifuge ist das Glykoprotein homogen, die Sedimentationskonstante (S_{20}°) beträgt 1,43. Das Molekulargewicht ist bei kombinierter Sedimentations- und Diffusionsmessung 19900. Es enthält die 16 verschiedenen Aminosäuren, die auch im Bence Jones'schen Protein vorkommen (21, 22, 24) und ist methioninfrei. Es unterschreitet sich von dem Gesamturprotein und dem Bence Jones'schen Eiweißkörper durch seine prozentuale Aminosäure-Zusammensetzung und besonders durch seinen bedeutend höheren Gesamtkohlenhydratgehalt. Bei einem Verhältnis Polypeptid:Kohlenhydrat = 1,5:1 haben wir 38,1% Gesamtkohlenhydrate, die aus 16,6% Hexosen, 4,5% Methylpentosen, 10,2% Hexosaminen und 6,8% Neuraminsäure bestehen. Wir fanden neben 8,1% Galaktose und 4,5% Mannose 4,0% Glukose, die bei anderen Glykoproteiden oder Mucoiden des Serums bis jetzt noch nicht beschrieben wurde (25–30). Bei den Mucoiden des Urins lag der Glukose-Gehalt niedriger (Tab. 5); (31–37). Neben der chromatographischen Sicherung der Glukose wurde im Hinblick auf die Bedeutung dieses Befundes noch der spezifische Ferment-Nachweis mit Glucoxydase (19) und Hexokinase-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (20) durchgeführt, da die Ausbeute zum spezifischen Osazon-Nachweis zu klein war. Der hohe Prozentsatz von Fucose mit 3,2% wurde bis jetzt bei anderen Serum- und Urin-Mucoiden noch nicht beschrieben (28, 29, 30, 34). Neben dieser Methylpentose liegt, soweit aus der chromatographischen Identifizierung mit alkalischem Silbernitrat und Perjodat-Benzidin zu entnehmen ist, auch noch eine zweite Methylpentose, und zwar Rhamnose, vor (34). Die 10,2% Hexosamine bestehen aus 8,4% Glukosamin und 1,8% Galaktosamin. Von den 6,8% Neuraminsäure dürften nach dem Ergebnis der stufenweisen Hydrolyse mit Ionenaustauscher nur

3–4% endständig sein. Die Sicherung dieses Ergebnisses müßte jedoch noch durch die Neuraminidase-Abspaltung der endständigen Neuraminsäure endgültig belegt werden. Hexosamine und Neuraminsäure liegen in dem Glykoprotein in der N-Acetylform vor. — Die Gesamtkohlenhydrate haben folgende molare Verteilung:

Galaktose : Mannose : Glukose : Fucose : Rhamnose : Glukosamin : Galaktosamin : Neuraminsäure = 10 : 5 : 5 : 4 : 2 : 8 : 2 : 5. Vergleicht man die Daten dieses Glykoproteids mit den Werten von bereits ausführlich untersuchten anderen Glykoproteiden und Mucoiden, wie sie in Tabelle 5 zusammengefaßt sind, dann findet man, daß das hier isolierte Glykoprotein mit seinem Molekulargewicht niedriger liegt als alle anderen bekannten Glykoproteide und Mucoide, die im Serum und Urin beschrieben wurden. Entsprechend dem Hexose-Gehalt, der elektrophoretischen Wanderung, dem isoelektrischen Punkt gleicht es in seiner Zusammensetzung am ehesten der Orosomucoid-Gruppe (25, 26, 29, 30, 38, 39). Jedoch erlauben der hohe Fucose-Gehalt, der Nachweis einer zweiten Methylpentose, das Vorkommen von Glukose und die Fällbarkeit in Trichloressigsäure eine eindeutige Differenzierung von diesem sauren Glykoprotein. Auch das Fehlen von Methionin im Polypeptid-Anteil ermöglicht eine Unterscheidung. Die von TAMM und HORSFALL jr. isolierten Harnmucoide (36) haben eine ähnliche Kohlenhydrat-Zusammensetzung, jedoch ein weit höheres Molekulargewicht, das bei etwa 1 Million liegt. Außerdem ist der Fucose-Gehalt niedriger und der Neuraminsäure-Anteil höher. Glukose wurde bei diesen Harnmucoiden nicht beschrieben. Die von KING und Mitarbeitern (34) und TUNIS und Mitarbeitern (37) analysierten Harnmucoide aus Normalurin und aus dem Urin von Leukämie-Patienten enthielten ebenfalls Glukose und relativ viel Methylpentose. Sie sind jedoch methioninhaltig und unterscheiden sich in ihrer quantitativen Kohlenhydrat-Zusammensetzung und dem Gesamtkohlenhydrat-Gehalt von dem hier beschriebenen Glykoprotein des Plasmocytom-Urins (Tab. 5). Auch die Unlöslichkeit in 10proz. Trichloressigsäure ist eine Eigenschaft des Glykoproteids, die bei den anderen Harnmucoiden nicht beschrieben wurde.

Diese Untersuchungen geben zwar noch keinen Einblick in die Konstitution des Glykopeptids, doch ist aus der stufenweisen Hydrolyse mit Ionenaustauscher und nachfolgender Dialyse bereits zu erkennen, daß die Neuraminsäure und die Methylpentosen sehr leicht abzuspalten sind. Es ist deshalb naheliegend, eine endständig oder benachbart endständige Stellung dieser Kohlenhydrate anzunehmen. Nur ein Teil der Hexosen ist mit Ionenaustauscher schon bei $\text{pH} = 5$, 100° zu hydrolysieren, der Rest wird erst bei $\text{pH} = 1$, 100° abgespalten. Der größte Anteil der Glukose und die gesamten Hexosamine wurden bei $\text{pH} = 1$, 100° hydrolysiert. Hierbei liegen die Versuchsbedingungen vor, unter denen auch die Aminosäuren des Glykoproteids hydrolysiert wurden.

Das aus der molaren Verteilung errechnete Molekulargewicht und die entsprechende Anzahl der C-, N- und S-Atome stehen mit dem gefundenen Molekulargewicht und der Anzahl der C-, N- und S-Atome in guter Übereinstimmung. Dies berechtigt zu der Annahme, daß wir mit 108 Aminosäuren und 41 Kohlenhydraten alle wesentlichen Komponenten des isolierten Glykoproteids erfaßt haben. Nach den Ergebnissen von NOLAN und SMITH (40, 41) sowie ROSVEAR und SMITH (42), die zeigen konnten, daß Glykoproteide durch Papain in Oligoglykopeptide gespalten werden, muß in Erwägung gezogen werden, ob beim Glykoproteid aus Plasmocytomurin nicht ähnliche Verhältnisse vorliegen. — Betrachtet man nun dieses Glykoproteid als Teil des Gesamturoproteins beim Plasmocytom, dann findet man, daß es erst einer Analyse zugänglich wird, wenn der Gesamtkomplex durch die zahlreichen Stufen der Aufarbeitung in die einzelnen Komponenten zerlegt ist. Das immunologisch heterogene Gesamturoprotein ist vor der Durchführung dieser Aufarbeitung bei Untersuchungen in der Papier-, Stärke-Gel-Elektrophorese und Ultrazentrifuge ein kohlenhydratarmer Proteinkomplex, der einheitlich erscheint, obgleich er aus dem Bence Jones'schen Protein, mehreren Lipidkomponenten und dem isolierten Glykoproteid besteht. Der hohe Kohlenhydratanteil des relativ niedermolekularen Glyko-

proteids dürfte für den Gesamturoprotein-Komplex, besonders für den Ausfall der Bence Jones'schen Kochprobe, eine wesentliche Bedeutung haben. Das Verhältnis des Glykoproteids zu dem Bence Jones'schen Protein ist für die reversible, irreversible oder partiell irreversible Koagulation des Uroproteins bei der Kochprobe entscheidend. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen lassen im Vergleich zu den Glykoproteiden des Serums und des Urins bei Gesunden und bei Patienten mit Proteinurie anderer Genese erkennen, daß das Glykoproteid aus Plasmocytomharn sowohl in seiner Aminosäure- und Kohlenhydratzusammensetzung als auch in seinen physiko-chemischen Eigenschaften eine Sonderstellung einnimmt, die für Paraproteinosen spezifisch sein könnte.

Wir danken Herrn Dr. F. KNÜCHEL, Herzheilstätte Königsstuhl der Landesversicherungsanstalt Baden, Heidelberg, für die Untersuchungen mit der Stärke-Gel-Elektrophorese, Herrn Dr. TRÄXLER und Fräulein I. HÖFER, Beckman Instruments GmbH., München, für die Bestimmungen des Molekulargewichtes mit der Ultrazentrifuge, Herrn Dr. H. OTTING, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, für die Aufnahme des Infrarotspektrums, Herrn Dr. F. A. ANDERER, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, für die quantitativen Aminosäure-Bestimmungen. Fräulein R. VÖLKER und Fräulein U. BURG, Medizinische Universitätspoliklinik Heidelberg, danken wir für ihre wertvolle Mithilfe bei allen biochemischen Untersuchungen.

Literatur

1. WEICKER, H. und K. HUHNSTOCK, *Klin. Wschr.* 39, 471 (1961).
- 2. WEICKER, H. und K. HUHNSTOCK, *Klin. Wschr.* 40, 44 (1962).
- 3. WEICKER, H. und K. HUHNSTOCK, *Dtsch. Arch. klin. Med.* 208, 389 (1962).
- 4. WEICKER, H. und K. HUHNSTOCK, *Nature London* 196, 480 (1962).
- 5. CLOTTEN, R. und A. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962).
- 6. KNÜCHEL, F., *Dtsch. Zschr. gerichtl. Med.* 51, 464 (1961).
- 7. SCHEIDEGGER, J. J., *Internat. Arch. Allergy* 7, 103 (1955).
- 8. OSSERMAN, E. F., *J. Immunol., Baltimore* 84, 93 (1960).
- 9. OUCHTERLONY, Ö., *Ark. Kemi Ser. B* 26, 1 (1949).
- 10. SVEDBERG, T. und K. O. PEDERSEN, *The ultracentrifuge* — Clarendon Press, Oxford (1940).
- 11. NORTHROP, J. H. und M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.* 12 543 (1929).
- 12. SPACKMAN, H. D., W. H. STEIN und S. MOORE, *Analytic. Chem.* 30, 1190 (1958).
- 13. DISCHE, Z. und L. B. SHETTLES, *J. biol. Chemistry* 175, 595 (1948).
- 14. SVENNERHOLM, L., *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 24, 604 (1957).
- 15. GARDELL, S., *Acta chem. scand.* 7, 207 (1953).
- 16. SCHWEIGER, A., *J. of Chromatogr.* (Amsterdam) 3, 374 (1962).
- 17. SCHOENEMANN, K., G. JESCHEK und K. FROMMHOLD, *Z. analyt. Chem.* 181, 338 (1961).
- 18. GARDELL, S., F. HEYENSKJOLD und A. ROCHMORLUND, *Acta chem. scand.* 4, 970 (1950).
- 19. SÜDHOF, H. und P. K. RIEGEL, *Klin. Wschr.* 38, 138 (1960).
- 20. BARTHELMAI, W. und R. CZOK, *Klin. Wschr.* 40, 585 (1962).
- 21. DENT, C. E. und G. A. ROSE, *Biochem. J.* 44, 610 (1949).
- 22. SCHREIER, K. und H. PLÜCKTHUN, *Klin. Wschr.* 30, 677 (1952).
- 23. SCHULTZE, H. E., K. HEIDE und H. HAUPT, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 7, 854 (1962).
- 24. EDELMAN, G. M. und J. A. GALLY, *J. Exper. Med.* 116, 207 (1962).
- 25. EASTON, J. A., J. HARDWICKE und P. H. WHITEHEAD, *J. Clin. Path., London* 15, 585 (1962).
- 26. KAMIYAMA, S. und K. SCHMID, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 58, 80 (1962).
- 27. SÜDHOF, H. und H. KELLNER, *Physiologie und klinische Bedeutung kohlenhydrathaltiger Körperstoffe*, S. Karger, Basel, S. 25—27 (1957).
- 28. SCHULTZE, H. E., *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 17, 77 (1961).
- 29. SCHULTZE, H. E., R. SCHMIDTBERGER und H. HAUPT, *Biochem. Z.* 329, 490 (1958).
- 30. WINZLER, R. J., *The plasmaproteins*, Academic Press, New York und London, Vol. 1 (1960).
- 31. BOURRILLON, R., P. CORNILLON und R. GOT, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 7, 506 (1962).
- 32. BOURRILLON, R., R. GOT und P. CORNILLON, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 6, 730 (1961).
- 33. BOURRILLON, R., R. GOT und J. MICHON, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 6, 91 (1961).
- 34. KING JR., J. ST., M. L. FIELDEN und W. H. BOYCE, *Arch. Biochem. Biophysics* 95, 424 (1961).
- 35. KING JR., J. ST., M. L. FIELDEN und W. H. BOYCE, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 7, 316 (1962).
- 36. TAMM, I. und F. L. HORSFALL JR., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 108 (1950).
- 37. TUNIS, M. und H. WEINFELD, *Cancer Res.* 22, 764 (1962).
- 38. EYLAR, E. H. und R. W. JEANLOZ, *J. biol. Chemistry* 237, 622 (1962).
- 39. LUNDBLAD, A. und J. BERGGARD, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 57, 129 (1962).
- 40. NOLAN, CH. und E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* 237, 446 (1962).
- 41. NOLAN, CH. und E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* 237, 453 (1962).
- 42. ROSEVEAR, J. W. und E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* 236, 425 (1961).

Professor Dr. med. H. Weicker
Medizinische Universitäts-Poliklinik
69 Heidelberg
Hospitalstr. 3